云　南　植　物　研　究　2005，27 (5)：552～556
Acta Botanica Yunnanica

齿瓣石斛多倍体的诱导初报

李　涵[1,2]，郑思乡[1]，龙春林[2]
(1 云南农业大学园林园艺学院，云南 昆明　650201；2 中国科学院昆明植物研究所，云南 昆明　650204)

摘要：采用多倍体育种技术，对云南的野生热带兰花齿瓣石斛（*Dendrobium devonianum*）进行多倍体诱导试验。利用秋水仙素作为诱导剂，对二倍体试管苗进行诱导，在短期内培育出多倍体植株。用 0.03％的秋水仙素处理齿瓣石斛丛生芽 24 h，其诱导效果最好。观察结果显示：多倍体齿瓣石斛材料在形态、气孔直径、染色体数目上都有变化。DNA 指纹图谱等方面都发生了显著的改变。多倍体齿瓣石斛试管苗出现了植株粗壮、叶片增厚等优良性状。此研究是多倍体育种技术在我国热带兰花育种中的一次成功尝试。

关键词：齿瓣石斛；多倍体
中图分类号：Q 945　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0253 - 2700 (2005) 05 - 0552 - 05

Induction of Polyploid of *Dendrobium devonianum*

LI Han[1,2]，ZHENG Si-Xiang[1]，LONG Chun-Lin[2]
(1 *College of Horticulture*，*Yunnan Agriculture University*，Kunming 650201，China；
2 *Kunming Institute of Botany*，*Chinese Academy of Sciences*，Kunming 650204，China)

Abstract：The polyploid breeding technique was used to induce polyploid of *Dendrobium devonianum*，an orchid occurring in the tropics of Yunnan with ornamental and medicinal values . The materials for polyploid breeding were *in vitro* seedlings of diploids . The polyploid plants could be induced in a short time with colchicines as mutagen . It resulted in the best inductive effect to use 0.03% colchicines to deal with the *in vitro* seedlings of diploids for 24 hours . The polyploid plants were different from those of diploids in morphology，stoma diameter，chromosome numbers，and DNA fingerprints . The *in vitro* seedlings of polyploid plant showed advantageous characteristics such as thicker stems and leaves . It is a successful case to apply polyploid breeding technique into the tropical orchid breeding in China .

Key words：*Dendrobium devonianum*；Polyploid

石斛（*Dendrobium* Sw .）是附生于高山岩石或树上的兰科植物，具有很高的观赏价值和药用价值。其切花花期长，花朵艳丽，是热带兰中栽培比较广泛的名贵花卉，也是目前国际花卉市场主要的盆花和切花品种之一。

基金项目：国家科技部（2004DKA30430）、中国科学院（KSCX2 - SW - 117）、国家自然科学基金（30170102）和美国国家科学基金（DEB - 0103795）资助项目
通讯作者：Author for correspondence .　E - mail：long@mail.kib.ac.cn
收稿日期：2005 - 01 - 17，2005 - 04 - 26 接受发表
作者简介：李涵（1979 - ）女，硕士，主要从事花卉育种研究。

齿瓣石斛（*Dendrobium devonianum* Paxt .）又名紫皮石斛、香棍草、紫皮兰、大黄草，具有较大的观赏价值和药用价值。茎下垂，稍肉质，叶纸质，叶鞘常具有紫色斑点；总状花序常数个，出自于落了叶的老茎上，具1～2花，花质地薄，开展，具香气，萼片白色，先端青紫色；花瓣与萼片同色，边缘具短流苏，具有三条脉；唇瓣近圆形，白色而带紫色先端，基部具短爪，两侧具紫色条纹，边缘具流苏；唇盘两侧各具1个黄色斑块，密布短毛；蕊柱白色，两侧具紫色条纹。(中国科学院昆明植物所编著，2003)。

石斛类植物富含总生物碱，以及粘液质、多糖、氨基酸、抗癌腓、类黄酮及淀粉等。《神农本草经》将其列为上品，味甘，微寒，无毒，入胃、肾经，具有益胃生津、滋阴清热功效（《全国中草药汇编》编写组，1983)。齿瓣石斛在云南加工成细黄草及大黄草，在上海和云南的药市作鲜石斛应用。

多倍体植株的次生代谢物含量增加，易产生大花、奇花。我们对云南热带本土石斛野生资源中的齿瓣石斛进行了多倍体诱导，以期培育筛选出药物含量高、观赏价值高的花药两用新品种。

1　材料与方法

1.1　材料

材料来自云南江城县热带地区原始森林中的野生齿瓣石斛（*Dendrobium devonianum* Paxt .)，经云南农业大学花卉研究所两年多的组织培养研究，成功获得大量稳定的组培苗。经体细胞染色体鉴定为二倍体，数目为 2n = 2x = 38。把这些二倍体材料接种于 1 2MS + 80 g L 香蕉泥培养基上，经 30～40 d 分化培养，可获得大量丛生芽，选择该丛生芽为诱导多倍体的基础材料。

1.2　方法

1.2.1　多倍体植株的诱导　采用化学诱导的方法，对二倍体齿瓣石斛进行多倍体诱导。选用秋水仙素作为诱导剂，在不同浓度（0%、0.03%、0.05%、0.1%)、不同处理时间（24 h、36 h、48 h、72 h）的条件下进行诱导。从中选择出最适宜的处理浓度和处理时间（王俐等，2001)。

在无菌条件下对齿瓣石斛丛生芽用秋水仙素溶液进行浸泡处理，后用无菌水漂洗数次，接种于 1 2MS + 6-BA 1.0 mg L + NAA 0.05 mg L + 80 g L 香蕉泥的培养基上，在 28℃，2 500 lx 的条件下进行无菌培养，并进行形态观察。

1.2.2　变异植株观察

(1) 形态初观察：多倍体植株在外部形态上会表现出植株粗壮、叶片颜色深、叶形发生改变等表现，较二倍体植株表现出明显的差异。

(2) 气孔观察：多倍体植株叶面表皮气孔的直径一般会比二倍体植株气孔大，单位面积内的气孔数目减少，可作多倍体变异植株的初步鉴定标准。在对外部形态特征进行初步筛选的基础上，对形态上变异明显的植株，撕取叶表皮进行制片，然后用显微镜观察测量气孔大小。

(3) 染色体观察：对气孔显著增大的变异株，取根尖采用 F-BSG 法进行制片，然后用 OLYMPUS 显微镜观察并照相。

1.2.3　指纹图谱分析　利用 SDS 微量提取法从组织培养材料叶片中提取 DNA（王爱民和李申，2002)，对引物进行筛选（初筛选：选出有扩增带的引物；再筛选：选重复性好的、稳定的引物)，然后进行 PCR 扩增，电泳检测结果，进行分析。

1.2.4　变异植株的稳定及扩繁　在本实验中，经秋水仙素诱导出的植株多为嵌合体，且嵌合率较高，经染色体鉴定发现有多种倍性的混倍现象。经染色体鉴定法鉴定出的多倍体变异齿瓣石斛植株，按其变异

后染色体数目的不同进行分类，采用不定芽技术结合组织培养（郑思乡和李利良，1996），不断分割多倍体茎、叶等材料，通过不断切割，再培养产生新的个体，纯化为完全多倍体，使其不发生分离。现通过该方法已得到了部分相对稳定的植株材料。接种于 1 2MS + 6-BA 1.0 mg L + NAA 0.05 mg L + 80 g L 香蕉泥培养基上进行稳定扩繁。待苗长到 2.5～3 cm 时，使用生根培养基 1 2MS + NAA 1.0 mg L + 80 g L 香蕉泥，20～25 d 根长达 1～1.5 cm。

1.2.5 炼苗移栽 当齿瓣石斛试管苗根长 1～1.5 cm 时，即可进行炼苗移栽。将其在 20℃条件下揭盖炼苗 2 d，转到温室中，移栽到经高温消毒的苔藓基质上，以稀释到 0.01% 浓度的营养液作为水肥进行喷施，保持 80%以上的湿度，炼苗成活率可达 90%以上。

2 结果

2.1 秋水仙素对齿瓣石斛丛生芽的诱导结果

在不同浓度及不同处理时间条件下，齿瓣石斛丛生芽对秋水仙素的敏感程度不同。由表 1 可知，齿瓣石斛丛生芽对秋水仙素较为敏感。浓度为 0.03%的秋水仙素对其处理 72 h 时，死亡率达 50%；浓度为 0.05%、0.1%时死亡率均超过了 50%，当处理时间达 72 h 时，死亡率达 96%（这里所指的死亡是指培养 1 个月后仍不能发育，以后逐渐死亡的丛生芽；变异株是指外部形态上有变异的试管植株）。

试验表明，用 0.03%的秋水仙素处理齿瓣石斛丛生芽 24 h，死亡率低，为 10%；变异率高，达 60%。诱导效果最好。

表 1 秋水仙碱不同浓度和处理时间对齿瓣石斛的诱变结果

Table 1 The induction effects of colchicines concentration and duration on *Dendrobium devonianum*

浓度（%）Concentration（%）	时间（h）Time（h）	处理苗数（棵）No. of treatment	死亡数（棵）No. of death	死亡率（%）Percentage of death（%）	变异苗数（棵）No. of mutation	变异率（%）Percentage of mutation（%）
0.00	24	50	0	0	0	0
	36	50	2	4	0	0
	48	50	5	10	0	0
	72	50	8	16	0	0
0.03	24	50	5	10	30	60
	36	50	7	14	18	36
	48	50	10	20	18	36
	72	50	25	50	10	20
0.05	24	50	28	56	8	16
	36	50	31	62	10	20
	48	50	37	74	4	8
	72	50	48	96	0	0

2.2 多倍体植株观察结果

2.2.1 外部形态观察 有部分经过处理的齿瓣石斛试管苗出现植株粗壮，叶片增厚，表面出现轻微皱折，叶色深绿，部分叶片畸形（叶片出现 1～2 深裂，有的叶片叶尖分叉或叶边缘出现锯齿状叶裂），植株生长速度减慢。经诱导出的根粗短，并出现轻微木质化（图 1：1～2）。

2.2.2 气孔观察 取经秋水仙素处理的部分试管苗上表皮，用光学显微镜观察气孔，发现其气孔直径增大 1～1.5 倍，单位面积内的气孔数目明显减少，保卫细胞内叶绿体大且颜色较深。

2.2.3 染色体数目观察 对初步筛选出的变异株用 F-BSG 进行染色体鉴定后发现，经秋水仙素处理的试管苗，染色体数目发生改变，但在数目上并不稳定。目前，在齿瓣石斛材

料中观察到染色体数目较为典型的有 60，80，140（图 1：3～6）。

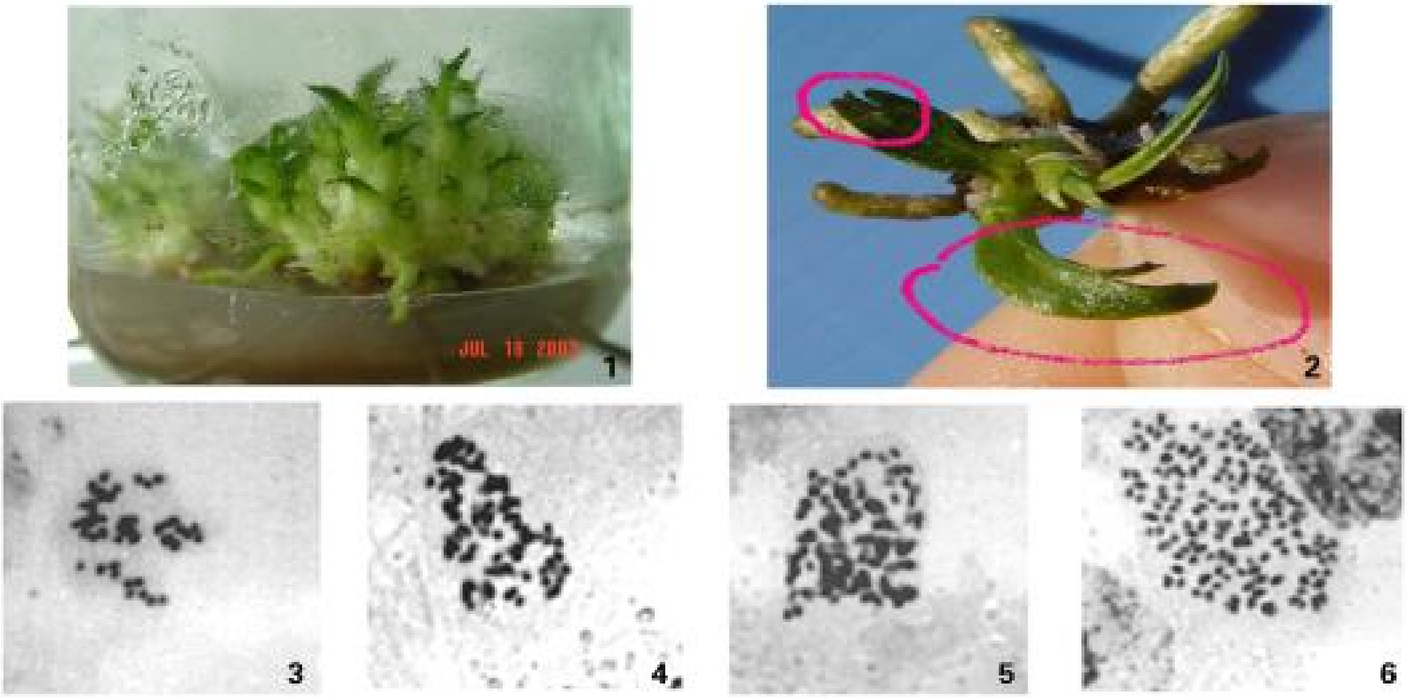

图 1　1．二倍体齿瓣石斛；2．多倍体齿瓣石斛；3．齿瓣石斛二倍体染色体数目（2n = 2x = 38）；4．齿瓣石斛非整倍体染色体数目（2n = 60）；5．齿瓣石斛非整倍体染色体数目（2n = 80）；6．齿瓣石斛非整倍体染色体数目（2n = 140）

Fig．1　1．Diploid *Dendrobium devonianum*；2．Polyploid *Dendrobium devonianum*；3．Diploid chromosome of *Dendrobium devonianum*（2n = 2x = 38）；4．Aneuploid chromosome of *Dendrobium devonianum*（2n = 60）；5．Aneuploid chromosome of *Dendrobium devonianum*（2n = 80）；6．Aneuploid chromosome of *Dendrobium devonianum*（2n = 140）

2.3　指纹图谱分析

从随机引物中筛选出 9 个稳定且条带清楚的引物，分别为 T07，AS19，B07，AS07，W16，AS12，AS13，B10，W16（引物从上海博亚生物技术有限责任公司购买）。

从 AS12 的 PCR 产物来看，S 系列（正常二倍体齿瓣石斛）与 SD 系列（多倍体齿瓣石斛）之间存在着明显的差异。在 S 系列产物中 S01，S10，S14，S24 之间不存在差异，而在 SD 系列产物中均存在着一定的差异（图 2）。故可以推断在多倍体诱导过程中，存在着较多的加倍类型或少数染色体结构的变异，为齿瓣石斛的多倍体育种创造了丰富的资源。同时也为多倍体新品种分子指纹图谱的建立及品种的保护奠定了基础。

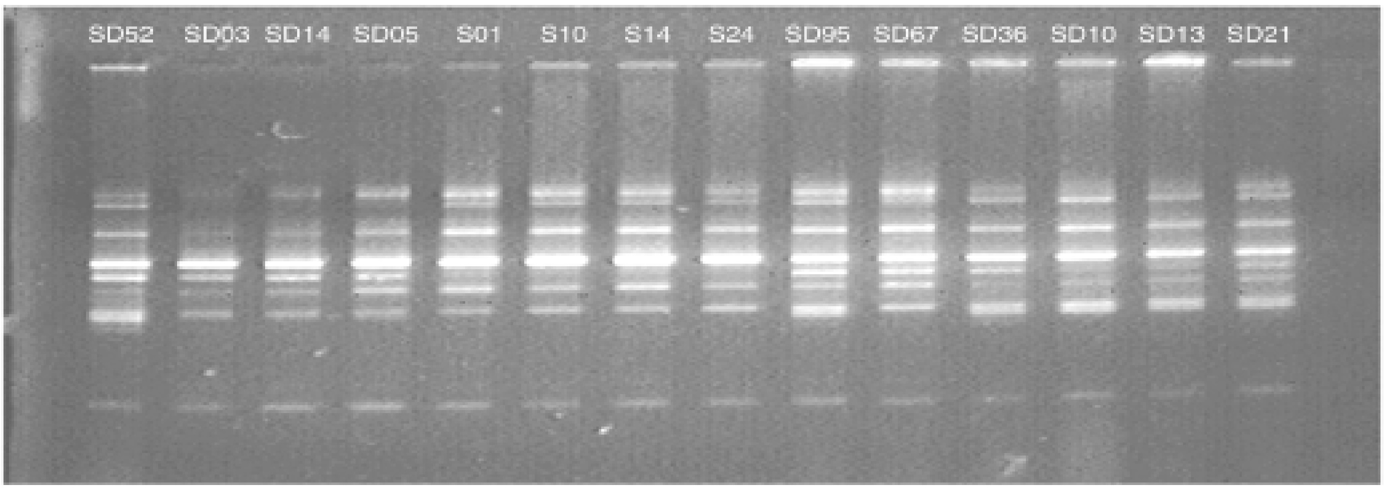

图 2　AS12 引物扩增结果

Fig．2　The differentiation of DNA fingerprints between diploid *Dendrobium devonianum* and polyploid m *Dendrobium devonianum*

3 讨论

齿瓣石斛作为药材其质量主要以药物含量作为指标，多倍体植物在生长过程中可加速次生代谢物的积累（程金水，2000），所以利用多倍体技术诱导齿瓣石斛的方法可作为探索培育提高药物含量、降低生产成本的育种方法。同时，也有望在田间生长过程中发现奇花品种，增加观赏花卉的品种资源。

经诱导后的变异石斛试管苗生长速度减慢，导致根系粗短，出现轻微木质化，尚未得到更为清晰的染色体照片。已采取多种改进方法进行对比实验，力求尽快获得质量更好的染色体照片。同时，在染色体鉴定过程中，发现有染色体数目混倍现象，现已对其开展进一步的分类和扩繁稳定，再次对其染色体进行鉴定。

有必要对齿瓣石斛二倍体和多倍体的药物含量进行分析对比和深入研究。

现已有部分多倍体材料炼苗移栽成活，将进一步在田间对其性状进行观察，并开展田间的一系列实验及对比测试。

〔参 考 文 献〕

中国科学院昆明植物所编著，2003．云南植物志第14卷［M］．北京：科学出版社，630

《全国中草药汇编》编写组，1983．全国中草药汇编（上册）［M］．北京：人民卫生出版社，248—250

程金水，2000．园林植物遗传育种学［M］．北京：中国林业出版社，177

Wang L（王俐），Zheng SX（郑思乡），Li ZL（李枝林），*et al*，2001．A preliminary study on the polyloid induction and variation of *Aloe vera*［J］．*Acta Bot Yunnan*（云南植物研究），23（4）：493—496

Wang AM（王爱民），Li S（李申），2002．Experimental report of RAPD reactions in two medicinal *Dendrobium* species［J］．*Chinese Materia Medica*（中草药），25：324

Zheng SX（郑思乡），Li LL（李利良），1996．Polyploid induction of *Asparagus* and its *in vitro* culture［J］．*Hunan Agric Sci*（湖南农业科学），1：22—23

* * * * * * * * * * * * * * * *

欢迎订阅2006年《武汉植物学研究》

《武汉植物学研究》为科学出版社出版、国内外公开发行的植物学综合性学术期刊（学报级）。主要报道植物学及各分支学科的基础研究和应用研究方面具创新性、有重要意义的最新研究成果，植物学研究的新技术、新方法等。栏目设置有：研究论文、技术与方法、综合评述、研究简报、学术讨论、重要书刊评介、学术动态等。主要读者对象为：从事植物学研究的科技人员、大专院校师生，以及相关学科，包括农、林、牧、医药、轻工、水产和环保等方面的工作者。

本刊为中国科技核心期刊、中国中文核心期刊，被中国科技论文与引文数据库（CSTPCD）、中国科学引文数据库（CSCD）、美国《化学文摘》（CA）、俄罗斯《文摘杂志》（AJ）等十多种国内外检索期刊、数据库作为核心期刊或统计源期刊收录。本刊曾荣获湖北省优秀科技期刊奖、全国优秀科技期刊奖、中国科学院优秀期刊奖。

本刊为双月刊，大16开本，双月末出版。国内定价15.00元，全年90.00元。邮发代号38-103，全国各地邮局均可订阅。如漏订，本刊编辑部可办理邮购。

编辑部地址：武汉市 武昌磨山 中科院武汉植物园内（或武汉市74006信箱）

邮政编码：430074；电话：027-87510755；E-mail：editor@rose.whiob.ac.cn